

Isolasi dan Identifikasi Entomopatogen *Hirsutella citriformis* (Speare) dan Potensi Miselianya sebagai Sumber Inokulum untuk Pengendalian Wereng Cokelat (*Nilaparvata lugens* Stål.) (Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungus *Hirsutella citriformis* [Spear] and the Potency of Mycelial Application for Brown Planthopper [*Nilaparvata lugens* Stål] Control)

Wawan^{1*}, Teguh Santoso², Ruly Anwar², dan Tri P. Priyatno¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: wawanlatif@gmail.com

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 28 Desember 2016; Direvisi: 27 Maret 2017; Diterima: 5 Mei 2017

ABSTRACT

Hirsutella citriformis is one of the potential entomopathogenic fungi of brown planthopper (BPH), but has not been widely used because it is difficult to propagate its conidia on artificial media, so it is necessary to find alternative propagule. This study aimed to identify isolates of *H. citriformis* that infect BPH and to test the effectiveness of mycelia as alternative inocula to conidia for BPH control. Fungal identification was done morphologically and molecularly based on its internal transcribed spacer sequence (ITS). Conidia and mycelia at various concentrations were sprayed against BPH nymphs of instar 2–3. The results showed that based on morphological characters, entomopathogenic fungi that attacked BPH in the field belonged to *H. citriformis*. Further identification based on the ITS sequence confirmed that isolate Bgr 0716 was *H. citriformis*. Mycelia of isolate Bgr 0716 effectively controlled BPH nymphs with the lethal time of 50% (LT₅₀) occurred within 13.3 days, which was not significantly different from the LT₅₀ conidia value (12.8 days). The lethal concentration value of 50% (LC₅₀) mycelia was 2.303 g/l, whereas the LC₅₀ value for conidia was 2.5×10^5 conidia/ml. With relatively low LT₅₀ and LC₅₀ values, it was considered that mycelia was feasible for large-scale applications because it is easier and faster to propagate mycelia than conidia. Therefore, *H. citriformis* mycelia is a good alternative propagule for development of effective biopesticide for BPH control.

Keywords: Entomopathogen, *Hirsutella citriformis*, biological control, brown planthopper.

ABSTRAK

Hirsutella citriformis merupakan salah satu jamur entomopatogen potensial untuk wereng batang coklat (WBC), tetapi belum banyak dimanfaatkan karena konidianya sulit diperbanyak sehingga perlu dicari propagul alternatif. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi isolat *H. citriformis* yang menginfeksi WBC dan menguji efektivitas miselinya sebagai alternatif inokulum konidia dalam pengendalian biologis WBC. Identifikasi *Hirsutella* dilakukan berdasarkan karakter morfologis dan molekuler dan berdasarkan sekuen *internal transcribed spacer* (ITS). Konidia dan miselia pada berbagai konsentrasi diaplikasikan pada nimfa WBC instar 2–3 dengan cara penyemprotan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan karakter morfologis, isolat jamur entomopatogen asal Bogor yang menyerang WBC di lapangan adalah *H. citriformis*. Salah satu isolat (Bgr 0716) telah diidentifikasi berdasarkan sekuen ITS dan terkonfirmasi sebagai *H. citriformis*. Aplikasi miselia isolat Bgr 0716 efektif mengendalikan WBC dengan nilai *lethal time* 50% (LT₅₀) selama 13,3 hari, tidak jauh berbeda dari nilai LT₅₀ konidia yang terjadi dalam waktu 12,8 hari. Nilai *lethal concentration* 50% (LC₅₀) miselia sekitar 2,303 g/l, sedangkan nilai LC₅₀ untuk aplikasi konidia adalah sebesar $2,5 \times 10^5$ konidia/ml. Dengan nilai LT₅₀ dan LC₅₀ yang relatif rendah tersebut, miselia layak untuk diaplikasikan dalam skala luas karena produksinya lebih mudah dan cepat dibanding dengan produksi konidia. Oleh karena itu, miselia *H. citriformis* dapat menjadi propagul aktif sebagai alternatif konidia untuk pengembangan biopestisida efektif terhadap WBC.

Kata kunci: Entomopatogen, *Hirsutella citriformis*, pengendalian biologis, wereng batang coklat.

PENDAHULUAN

Spesies jamur entomopatogen yang sering dilaporkan menyerang wereng batang cokelat (WBC), yaitu *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* Gams & Rozsypal (Li et al. 2012), *Beauveria bassiana* dan *Hirsutella citriformis* (Humber 2005), *Aspergillus flavus* dan *A. Niger* (Satpathi et al. 2016). Namun, di antara spesies jamur tersebut hanya *H. citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) yang masih belum banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk pengendalian WBC. *H. citriformis* memiliki patogenisitas tinggi terhadap WBC dan efektif menekan populasi WBC sehingga berpotensi mengendalikan populasi WBC di lapangan. Hal ini ditunjukkan dengan sering terjadinya epizootik pada populasi WBC di lapangan oleh *H. citriformis* daripada oleh *M. anisopliae* dan *B. bassiana* yang lebih sering menyebabkan epizootik pada perbanyakan WBC di rumah kaca. Pada saat terjadi epizootik, intensitas serangan *H. citriformis* pada populasi WBC dapat mencapai 15–30%. Epizootik *H. citriformis* juga pernah dilaporkan pada populasi serangga *Diaphorina citri* di pertanaman jeruk di Lumajang dengan tingkat mortalitas 30% (Dwiastuti 2005), 60–70% di Jombang, 82,9% di BPP Jatinom, dan 52,2% di Macanan (Subandiyah et al. 2000). Tingginya epizootik *H. citriformis* dengan entomopatogen lainnya disebabkan oleh mumi serangga yang mati terserang (*H. citriformis*) yang selalu melekat pada tanaman dan berada pada posisi yang efektif untuk sumber penyebaran konidia ke dalam populasi WBC. Di samping itu, pelekatan mumi WBC pada batang dan daun juga mengindikasikan bahwa *H. citriformis* sangat patogenik dan miselinya berkembang sangat cepat untuk memumifikasi WBC.

Upaya pemanfaatan *H. citriformis* sebagai agen biokontrol hama di lapangan sebenarnya telah lama dilakukan. (Rombach et al. 1986) menggunakan campuran konidia dan miselia *H. citriformis* untuk mengendalikan WBC. Aplikasi *H. citriformis* yang dikombinasikan dengan *B. bassiana* mampu mengendalikan 70% populasi *D. citri* di lapangan dibanding dengan aplikasi tunggal yang hanya mencapai 52,9% (Dwiastuti et al. 2007). Namun demikian, pemanfaatan *H. citriformis* dalam skala luas terkendala oleh perbanyakan inokulum konidia karena *H. citriformis* memiliki tingkat sporulasi sangat rendah pada media buatan (Dwiastuti 2005; Rombach et al. 1986).

Selain konidia atau spora, potongan hifa dan blastospora juga dapat digunakan sebagai sumber inokulum jamur entomopatogen (Dwiastuti 2005; Wahyudi 2008). Namun, potongan hifa dan blastospora bukan agen infeksi. Proses infeksi tetap

dilakukan oleh spora atau konidia yang bersprorulasi dari hifa dan blastospora setelah diaplikasikan di lapangan. Hal ini yang menyebabkan aplikasi dengan hifa dan blastospora menimbulkan efek kematian yang lebih lambat antara 3–5 hari dibanding dengan aplikasi dengan spora. Hal ini menjadi alternatif yang tepat untuk jamur entomopatogen yang sukar diperbanyak sporanya pada media buatan, seperti genus *Hirsutella* (Jackson et al. 2010). Keuntungan penggunaan hifa sebagai sumber inokulum adalah proses produksinya yang lebih mudah dan cepat, serta memiliki viabilitas tinggi, baik dalam berbagai formulasi biopestisida maupun setelah diaplikasikan di lapangan (Wraight et al. 2001).

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi isolat *H. citriformis* yang menginfeksi WBC dan menguji efektivitas miselinya sebagai alternatif inokulum konidia dalam pengendalian biologis WBC.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Kaca Kebun Percobaan Cikeumeuh, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor. Tanaman padi varietas Ciherang yang digunakan dalam pengujian dipelihara di rumah kaca hingga berumur 30 hari sampai 45 hari setelah tanam (hst) dalam pot plastik bervolume 1 liter. WBC diperbanyak pada varietas Ciherang di rumah kaca hingga instar 2 atau 3

Isolasi *H. citriformis*

Mumi WBC dengan gejala terserang *H. citriformis* diperoleh dari tanaman padi varietas Ciherang di dua lokasi di Bogor, yakni Bgr 0716 (Cimanggu, koordinat 6° 34' 31,99" LS dan 106° 47' 8,16" BT) dan Bgr 0916 (Cibeureum, koordinat 6° 39' 3,27" LS dan 106° 46' 51,05" BT). Mumi WBC disterilkan dengan cara mencelupkan spesimen ke dalam wadah berisi etanol 70% selama beberapa detik, kemudian dibilas dengan akuades steril. Selanjutnya, mumi dicelupkan ke dalam larutan Sodium hipoklorit 0,5%, dibilas kembali dengan akuades steril dan dikeringanginkan di atas kertas saring *Whatman* steril. Mumi diinkubasi di atas kertas saring *Whatman* steril yang dilembapkan untuk merangsang sporulasi (Toledo et al. 2013). Setelah 2 hari inkubasi pada suhu kamar, konidia diisolasi dengan teknik isolasi spora tunggal. Setiap konidia dipisahkan satu per satu dari kumpulan konidia menggunakan jarum kaca steril di bawah mikroskop, kemudian konidia tunggal diinkubasi selama 5 hari pada media agar air 2%

hingga berkecambah dan dijaga agar tidak terkontaminasi bakteri dan jamur lainnya. Konidia yang telah berkecambah dipindahkan ke media *potato dextrose agar* yang mengandung *yeast extract* 0,5% (PDAY 0,5%) dalam tabung reaksi hingga digunakan untuk penelitian selanjutnya

Identifikasi Morfologi dan Molekuler *H. citriformis*

Identifikasi *H. citriformis* secara morfologis dilakukan berdasarkan warna koloni, ukuran konidia, hifa, dan konidiofor menggunakan prosedur dari Humber (2005) dan Deacon (2006). Pengamatan karakter morfologis jamur menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51).

Identifikasi secara molekuler terhadap isolat Bgr 0716 dilakukan dengan mengamplifikasi sekuen DNA *internal transcribed spacer 1* (ITS1) yang berada pada posisi 18S rDNA dan 5,8S rDNA, serta *internal transcribed spacer 2* (ITS2) pada posisi 5,8S rDNA dan 28S rDNA menggunakan pasangan marka ITS1 5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3' dan ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGAATA-3'. DNA genomik diekstraksi dari miselia hasil pembiakan pada media cair *potato dextrose yeast extract* (PDY) 0,1% selama 2 minggu pada suhu kamar. DNA diekstraksi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid Biotech, Taiwan) sesuai protokol. Kuantitas DNA dicek dengan spektrofotometer dan kualitasnya dengan elektroforesis. Amplifikasi urutan DNA ITS dilakukan dengan teknik PCR mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Simmons et al. (2015). Komponen reagen PCR dengan total volume 25 µl dalam tabung PCR (0,2 ml) yang terdiri atas larutan penyangga PCR 10× sebanyak 2,5 µl; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; marka ITS1 dan ITS4 masing-masing 0,5 µM; Taq polimerase DNA 1U; ekstrak DNA 0,2 ng. Reaksi amplifikasi dilakukan dalam mesin PCR tipe PCT-100 (MJ Research, AS). Tahapan PCR yang digunakan adalah denaturasi pertama (95°C selama 3 menit), 30 siklus untuk denaturasi pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan marka pada suhu 60°C selama 30 detik, pemanjangan marka 72°C selama 1 menit, dan diakhiri dengan satu siklus pemanjangan marka pada suhu 72°C selama 10 menit. Produk PCR diseparasi pada gel agarosa 1% dalam larutan TAE 1× dan divisualisasi dengan *ChemiDoc™ Gel Imaging System* (Bio-Rad, AS) di bawah pencahayaan ultraviolet setelah diwarnai dengan Etidium bromida. Produk PCR yang berukuran 590 bp diekstraksi menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Kit* (Geneaid Biotech, Taiwan) untuk dirunut melalui jasa perunutan DNA *1st BASE DNA Sequencing Services* (Malaysia). Urutan DNA yang diperoleh diolah menggunakan perangkat lunak

Sequence Scanner v1.0 dan *CLC Sequence Viewer* 6.7.1.

Hasil perunutan DNA dikonfirmasi ke pangkalan data urutan nukleotida di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) melalui *Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide* (BLASTN) untuk mengetahui tingkat kedekatan dengan urutan nukleotida yang telah tersimpan di bank gen (*GenBank®*). Hubungan kekerabatan genetik dianalisis menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 7.0.18) menggunakan metode *neighbor-joining* dengan *bootstrap* sebanyak 1.000 ulangan. Jamur *Nomuraea anemonoides* (No. akses: EU553340) digunakan sebagai pembanding di luar grup.

Keefektifan Konidia *H. citriformis* terhadap WBC

Konidia diperoleh dari miselia isolat Bgr 0716 yang bersporulasi di dalam cawan petri beralaskan kertas saring dengan tahapan sebagai berikut: sebanyak 1 g miselia dari biakan pada media cair PDY 0,5% berumur 15 hari disaring dan dicuci dengan air distilasi steril. Miselia ditabur di atas kertas saring steril di dalam cawan petri dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar hingga membentuk sinemata dan bersporulasi. Konidia dipanen dan disuspensikan dalam air distilasi steril, lalu disesuaikan kerapatannya menjadi 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ konidia/ml air distilasi dan ditambah dengan bahan perekat Triton X-100 sebanyak 0,02%.

Suspensi konidia disemprotkan pada tanaman padi varietas Ciherang berumur 30 hst yang disungkup plastik milar dan telah diinfestasi dengan 15 ekor nimfa *N. lugens* instar 3 atau 4 per rumpun. Volume semprot sebanyak 5 ml per rumpun tanaman. Tanaman yang disemprot dengan air distilasi steril digunakan sebagai kontrol. Tanaman diinkubasi dalam kondisi lembap pada suhu 25°C. Setelah 3 hari inkubasi, pot-pot perlakuan dipindahkan ke rumah kaca. Pengamatan serangga yang mati dan menjadi mumi dilakukan setiap hari selama 15 hari.

Keefektifan Miselia *H. citriformis* terhadap WBC

Miselial isolat Bgr 0716 diperbanyak pada media cair PDY 0,5% selama 2 minggu pada suhu kamar, kemudian dipanen dengan penyaringan menggunakan kain kasa dan pembilasan beberapa kali menggunakan air distilasi steril. Selanjutnya, miselia dalam pelarut air distilasi dengan konsentrasi 0, 4,2, 8,3, 16,7, 33,3 g/l dipotong-potong menggunakan blender pada kecepatan 1.500 rpm selama 3 menit. Suspensi miselia disemprotkan pada tanaman padi varietas Ciherang yang berumur 45 hst dan memiliki 6 batang/

rumpun. Tanaman disemprot suspensi miselia dengan volume 30 ml/rumpun. Tanaman disungkup dengan plastik milar kemudian diinfestasi dengan WBC instar 2–3 sebanyak 25 ekor per rumpun. Setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas WBC dan sporulasi miselia setiap hari selama 20 hari. Pengamatan sporulasi dilakukan dengan memasang *spore trap* berupa *glass slide* berlapis gelatin (0,1%) yang dipasang di pangkal batang rumpun padi. Konidia yang tertangkap di *spore trap* diamati di bawah mikroskop cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Morfologi *H. citriformis*

Biakan murni isolat Bgr 0716 pada media cair PDY memiliki miselia berwarna putih keabu-abuan, tumbuh sangat lambat, dan kompak. Lambatnya pertumbuhan *H. citriformis* pada media kultur dilaporkan oleh Casique-Valdez et al. (2011), Meyer et al. (2007), dan Pérez-González et al. (2015). Karakter morfologis khas *Hirsutella* yang membedakannya dengan *B. bassiana* dan *M. anisopliae* adalah munculnya sinemata berbentuk seperti rambut pada mumi WBC yang mati terserang entomopatogen. Penamaan kata *hirsutella* berasal dari bahasa Yunani *hirsutus* yang artinya berambut dan *ella* yang menggambarkan sel yang panjang kemudian menyempit (Vega dan Kaya 2007).

Sinemata merupakan bagian dari struktur sporulasi *Hirsutella*. Panjang sinemata rata-rata $3,81 \pm 0,5$ mm, dan dapat bercabang membentuk sinemata sekunder dan tersier bergantung pada kondisi kelembapan. Bahkan, pada kondisi kelembapan tinggi panjang sinemata dapat mencapai 10 mm. Dari sinemata tumbuh konidiofor dengan panjang rata-

rata $35,447 \pm 3,144$ μm , sedangkan konidia yang ada di ujung konidiofor berukuran rata-rata $7,951 \pm 0,492$ μm . Konidia berwarna hialin dan berbentuk seperti juring buah jeruk (Tabel 1). Morfologi jamur entomopatogen yang menginfeksi WBC ini mirip dengan *H. citriformis* (Gambar 1) dan tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan oleh Humber (2005). Penamaan spesiesnya sesuai dengan bentuk konidia yang seperti juring jeruk (*citriformis*).

Sinemata tumbuh secara tidak merata pada 15 hari setelah inkubasi. Umumnya, sinemata tumbuh pada bagian tengah biakan atau di ujung miselia yang berdekatan dengan dinding cawan petri atau tabung reaksi. Rendahnya tingkat pembentukan sinemata tersebut menunjukkan bahwa tingkat sporulasi *H. citriformis* pada media biakan sangat rendah. Pertumbuhan miselia yang lambat dan tingkat sporulasi rendah pada media biakan juga dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Casique-Valdez et al. 2011; Meyer et al. 2007; Pérez-González et al. 2015; Subandiyah et al. 2000) sehingga menjadi kendala pemanfaatan *H. citriformis* untuk pengendalian biologi WBC skala luas.

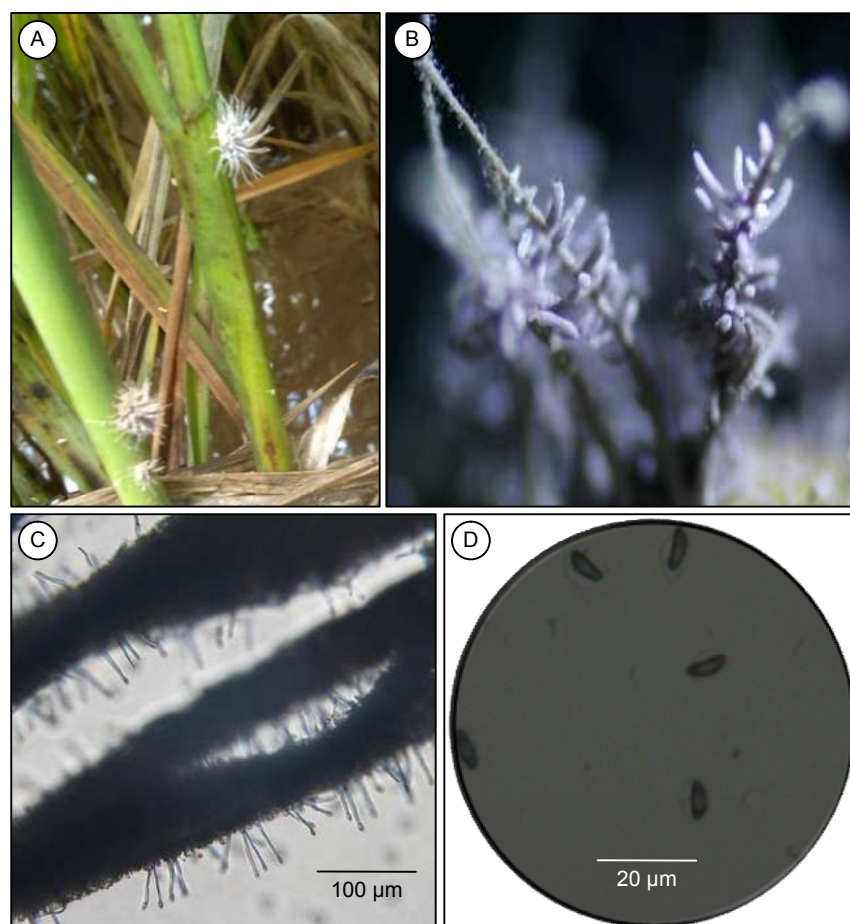
Perkecambahan konidia hasil isolasi spora tunggal berlangsung dari 14 hari sampai 62 hari, sedangkan sinemata terbentuk dalam 20 hari sampai 32 hari kemudian, jadi total dari perkecambahan konidia sampai terbentuknya sinemata adalah 34 hari sampai 94 hari (Tabel 2). Konidia isolat Bgr 0916 berkecambah 3 hari lebih cepat, tetapi membentuk sinemata 5 hari lebih lama dibanding dengan isolat Bgr 0716.

Identifikasi Molekuler *H. citriformis*

Hasil amplifikasi sekuen DNA ITS isolat Bgr 0716 menggunakan pasangan marka ITS1/ITS4 diperoleh satu fragmen tunggal berukuran sekitar ± 600 bp

Tabel 1. Morfologi *Hirsutella citriformis* isolat Bgr 0716 dan Bgr 0916 pada wereng batang cokelat (WBC) dan media *potato dextrose agar* yang mengandung *yeast extract* 0,5% (PDAY 0,5%).

Parameter	Isolat Bgr 0716		Isolat Bgr 0916		Rata-rata
	WBC	PDAY 0,5%	WBC	PDAY 0,5%	
		Konidia			
Panjang (μm)	$8,260 \pm 0,600$	$7,914 \pm 0,447$	$8,150 \pm 0,491$	$7,480 \pm 0,428$	$7,951 \pm 0,492$
Tebal (μm)	$3,84 \pm 0,615$	$2,94 \pm 0,606$	$3,310 \pm 0,473$	$2,490 \pm 0,428$	$3,145 \pm 0,531$
Warna	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin	
Bentuk	Juring buah jeruk	Juring buah jeruk	Juring buah jeruk	Juring buah jeruk	
		Konidiofor			
Panjang (μm)	$33,034 \pm 3,870$	$34,533 \pm 3,759$	$38,561 \pm 4,336$	$35,663 \pm 0,614$	$35,448 \pm 3,145$
Lebar atas (μm)	$1,554 \pm 0,292$	$1,250 \pm 0,000$	-	-	$1,402 \pm 0,146$
Lebar bawah (μm)	$1,949 \pm 0,264$	$3,800 \pm 0,123$	-	-	$2,875 \pm 0,194$
		Sinemata			
Panjang (mm)	$4,09 \pm 0,40$	$3,753 \pm 0,676$	$3,861 \pm 0,504$	$3,531 \pm 0,595$	$3,809 \pm 0,544$
Diameter (mm)	$0,11 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,083 \pm 0,010$



Gambar 1. Morfologi *H. citriformis*. A. Mumi WBPC terserang *H. citriformis*; B. Sinemata; C. Kondiofor; dan C. Konidia.

Tabel 2. Waktu perkecambahan dan pembentukan sinemata jamur *H. citriformis* pada media PDAY 0,5%*.

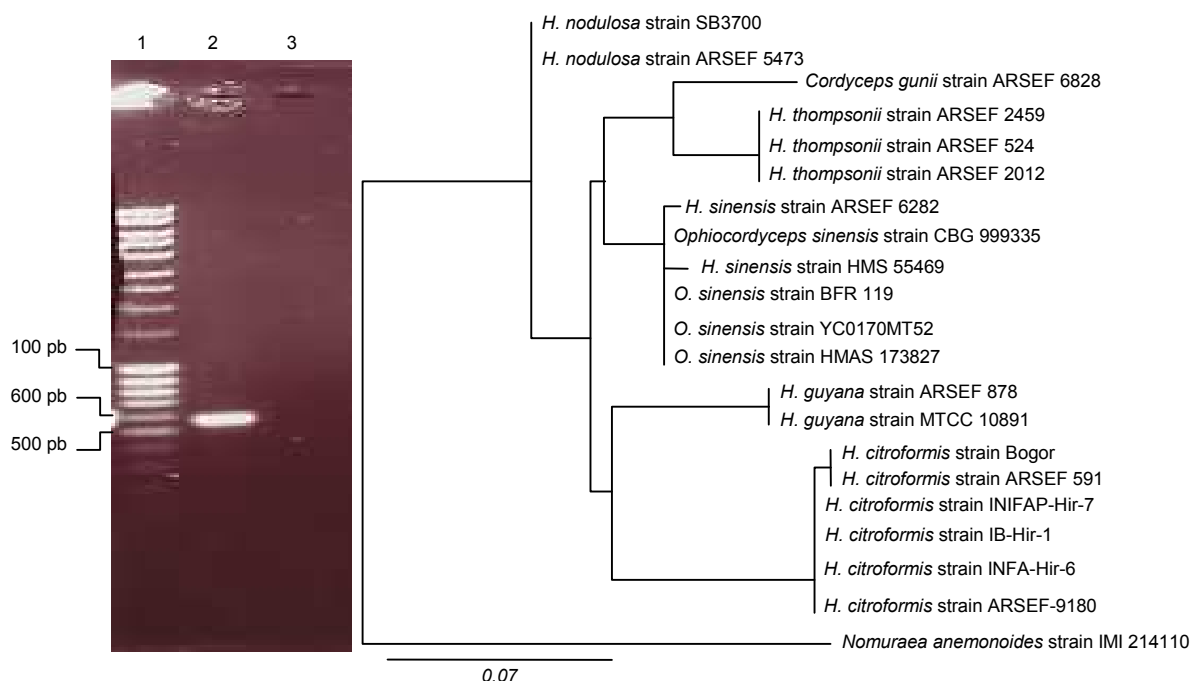
Isolat	Perkecambahan konidia (hari)	Pembentukan sinemata (hari)	Total lama pertumbuhan (hari)
Bgr 0716	14–62 hari	24–30 hari	38–92
Bgr 0916	15–45 hari	20–32 hari	35–97

*Rata-rata dari 10 biakan murni.

sesuai dengan yang ditargetkan (Gambar 2A). Hasil analisis penyejajaran BLASTN nukleotida ITS dengan nukleotida yang terdapat di pangkalan data GenBank® menunjukkan bahwa sekuan ITS isolat Bgr 0716 memiliki tingkat kesamaan 100% dengan sekuen ITS *H. citriformis* isolat ARSEF 591 yang disolasi dari *N. lugens* asal Indonesia dan Filipina (Tabel 3). Analisis filogenetik juga menunjukkan bahwa *H. citriformis* isolat Bgr 0716 satu grup dengan *H. citriformis* asal inang WBC (Simmons et al. 2015) dan *D. citri* (Subandiyah et al. 2000). Dengan demikian, secara morfologis dan molekuler terkonfirmasi bahwa spesies *Hirsutella* isolat Bgr 0716 yang menginfeksi WBC Bogor adalah *H. citriformis*.

Keefektifan Konidia dan Miselia *H. citriformis* terhadap WBC

Hasil uji keefektifan aplikasi konidia menunjukkan bahwa mortalitas serangga WBC mulai terjadi pada 6 hari setelah aplikasi (hsa) pada perlakuan dengan kerapatan konidia 10^6 konidia/ml dan 10^7 konidia/ml. Persentase mortalitas terus meningkat dan mencapai mortalitas tertinggi pada 15 hsa (Gambar 3A). Berdasarkan analisis probit, waktu yang diperlukan untuk menimbulkan mortalitas 50% (LT_{50}) pada aplikasi konidia dengan konsentrasi 10^7 konidia/ml adalah 12,8 hari (Gambar 3B). Persentase mortalitas kumulatif sebesar 24,4–75,6%. Tingkat keefektifan ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Dwiastuti dan Kurniawati (2007) yang melaporkan bahwa konsentrasi konidia *H. citriformis* paling efektif



Gambar 2. Identifikasi molekuler *H. citriformis* isolat Bgr 0716 berdasarkan urutan DNA ITS. A = produk PCR hasil amplifikasi fragmen DNA ITS dengan pasangan marka ITS1 dan ITS4; Lajur 1 = penanda DNA marker 1 kb, lajur 2 = fragmen DNA ITS, lajur 3 = kontrol; B = pohon filogenetik kekerabatan *H. Citriformis* isolat Bogor.

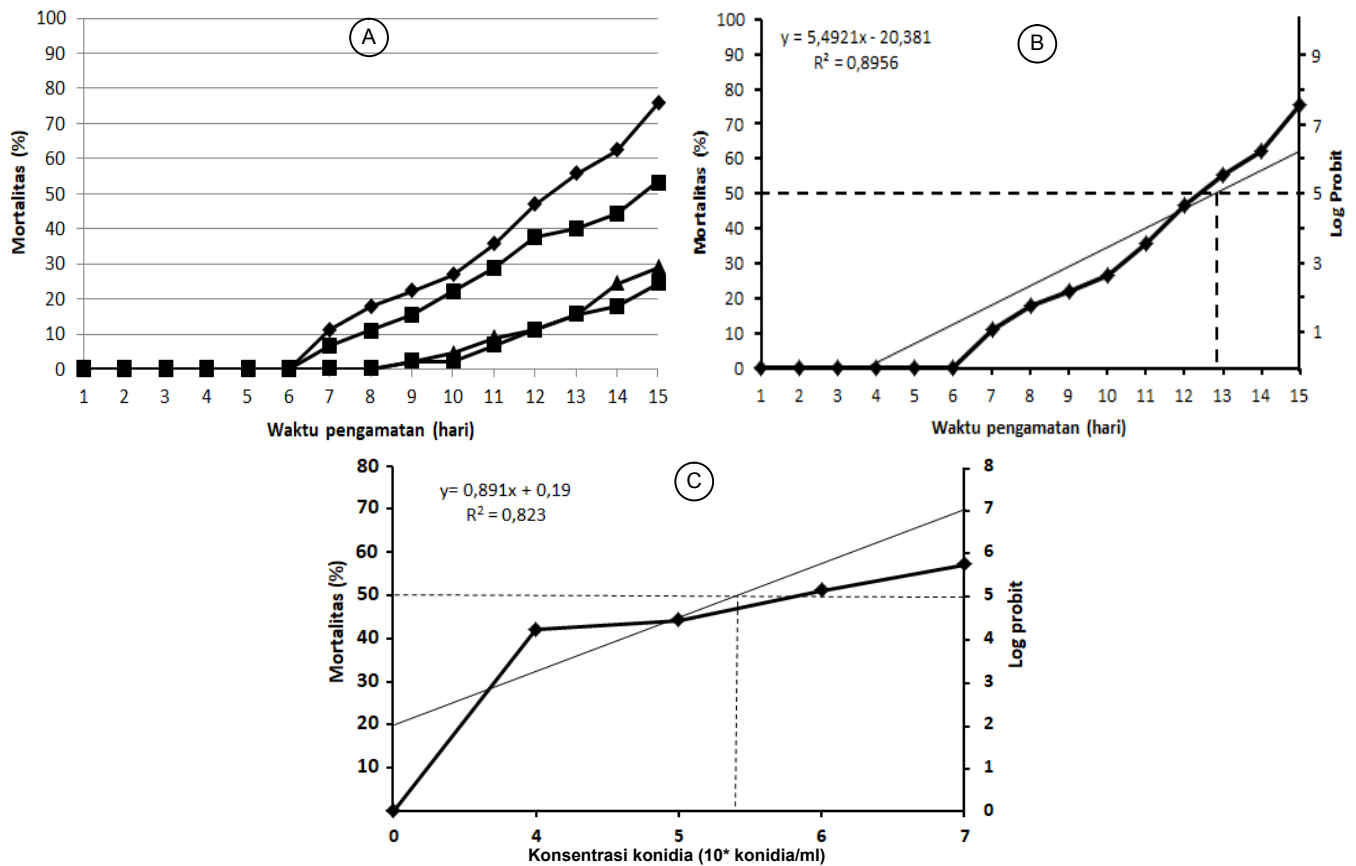
Tabel 3. Tingkat kesamaan nukleotida gen ITS *H. citriformis* isolat Bgr 0716 asal WBC dengan nukleotida yang tersedia di *GenBank*® berdasarkan analisis BLASTN.

Lokus/organisme/gen Target	Inang/negara asal	Persentase	
		Query cover	Kesamaan
KM652156/ <i>Hirsutella citriformis</i> voucher ARSEF 9180	<i>Diaphorina citri</i> /Mexico	99%	99%
KM652152/ <i>H. citriformis</i> voucher ARSEF 591	<i>Nilaparvata lugens</i> /Indonesia	97%	100%
KM652151/ <i>H. citriformis</i> voucher ARSEF 490	<i>N. lugens</i> /Filipina	97%	100%
KC911851/ <i>H. citriformis</i> strain INIFAP-Hir-7	<i>D. citri</i> /Mexico	99%	99%
KM652154/ <i>H. citriformis</i> voucher ARSEF 1446	<i>Haplaxius crudus</i> /Amerika	98%	99%

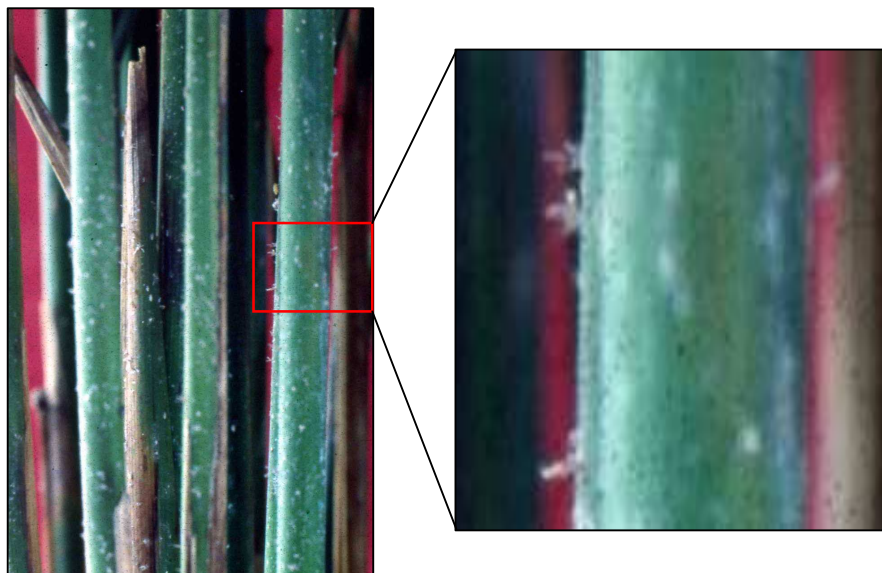
mengendalikan *D. citri* terjadi pada 10^6 – 10^7 konidia/ml. Berdasarkan analisis probit, diketahui bahwa konsentrasi konidia yang efektif dalam menimbulkan mortalitas 50% (LC_{50}) berkisar pada kerapatan $2,5 \times 10^5$ konidia/ml (3C).

Berbeda dengan aplikasi konidia *H. citriformis* yang langsung ditargetkan pada serangganya, aplikasi miselia lebih diarahkan untuk memaksimalkan pelekatan miselia pada tanaman padi. Hasil aplikasi miselia pada tanaman padi menunjukkan pelekatan miselia yang cukup baik pada batang dan daun tanaman padi dan berhasil membentuk sinemata pada 2–3 hsa (Gambar 4). Konidia yang disporulasi oleh sinemata mulai teramati pada *spore trap* 3 hsa dan mencapai puncaknya pada 4–5 hsa (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa aplikasi miselia baru akan efektif menimbulkan infeksi pada WBC pada 3 hsa.

Gambar 5B menunjukkan laju mortalitas harian WBC setelah aplikasi miselia *H. citriformis*. Mortalitas WBC mulai terjadi pada 6–7 hsa dan terus meningkat dengan laju mortalitas tertinggi pada 11–15 hsa. LT_{50} pada aplikasi miselia dengan konsentrasi 33,3 g/l adalah 13,3 hari. Dengan demikian, nilai LT_{50} miselia ini tidak berbeda jauh dengan nilai LT_{50} konidia yang terjadi pada 12,8 hsa. Tingkat efikasi konsentrasi miselia terhadap WBC pada 20 hsa disajikan pada Gambar 5C. Aplikasi miselia dengan konsentrasi 4,2–33,3 g/l mampu menimbulkan kematian WBC antara 60–100%. Berdasarkan analisis probit, nilai LC_{50} aplikasi miselia *H. citriformis* untuk mengendalikan WBC adalah 2,303 g/l. Artinya, untuk aplikasi per hektar dengan dosis semprot 600 liter diperlukan 1.382 g miselia. Jumlah ini relatif tidak sedikit untuk aplikasi skala luas sehingga perlu diteliti teknik perbanyakan miselia *H. citriformis* yang murah, mudah, dan cepat.



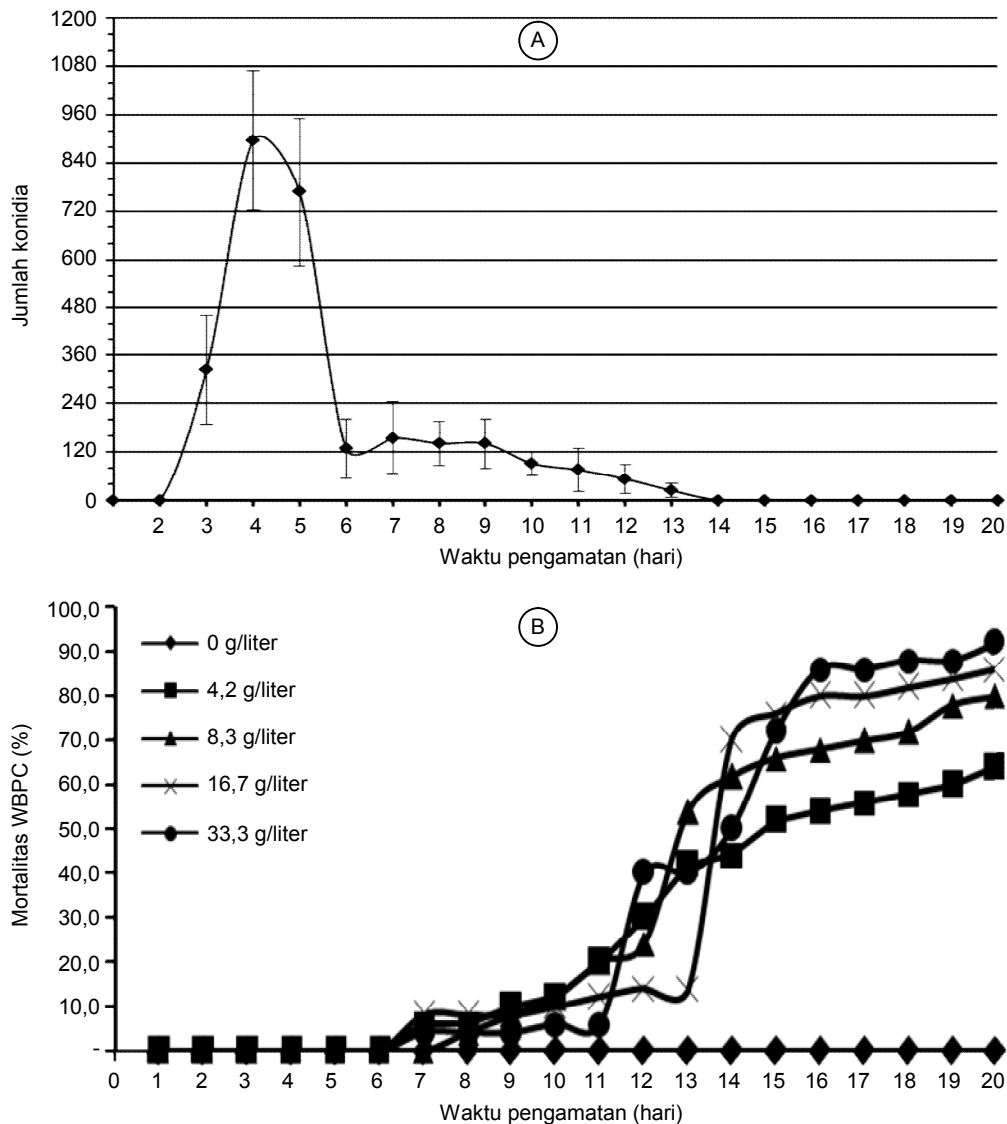
Gambar 3. Pengaruh kerapatan konidia *H. citriformis* isolat Bgr 0716 terhadap mortalitas WBC selama 15 hari. A = laju mortalitas WBC oleh infeksi konidia, B = analisis probit LT₅₀ WBC yang dipaparkan konidia dengan konsentrasi 10⁷ konidia/ml, C = analisis probit LC₅₀ WBC yang diaplikasikan konidia.



Gambar 4. Sinemata yang tumbuh dari hasil penyemprotan miselia *H. citriformis* pada tanaman padi.

Namun, dengan mempertimbangkan kesulitan sporulasi *H. citriformis* pada media biakan, pemanfaatan

propagul miselia diduga akan lebih efisien untuk pengembangan biopestisida.



Gambar 4. Pengaruh potongan miselia *H. citriformis* terhadap mortalitas WBC. A = sporulasi miselia yang diaplikasikan pada tanaman padi, B = tingkat mortalitas WBC yang terinfeksi *H. citriformis*.

Aplikasi konidia dan miselia *H. citriformis* mampu menimbulkan mortalitas pada nimfa dan imago WBC, namun laju mortalitas tertinggi terjadi setelah serangga mencapai stadia imago. Hal ini berbeda dengan laporan Yunimar et al. (2003) dalam Dwiastuti dan Kurniawati (2007) yang menyatakan bahwa *H. citriformis* hanya menyerang serangga dewasa *D. citri* dan belum pernah ditemukan menginfeksi stadia nimfa di lapangan. Rendahnya persentase stadia nimfa yang terinfeksi *H. citriformis* disebabkan oleh stadia perkembangan nimfa antarinstar yang pendek dan disertai pelepasan kulit pada setiap perubahan instar sehingga konidia jamur yang telah melekat di kulit serangga dapat terlepas dan gagal menginfeksi.

Faktor penting keberhasilan aplikasi miselia sebagai sumber inokulum adalah kondisi kelembapan yang baik di sekitar pertanaman karena sporulasi miselia memerlukan tingkat kelembapan tinggi. Kondisi tersebut tersedia pada saat tanaman telah mencapai stadia anakan. Oleh karena itu, aplikasi miselia untuk pengendalian WBC di lapangan sebaiknya dilakukan ketika tanaman padi yang telah mencapai stadia anakan. Priyatno dan Kardin (1993) juga melaporkan bahwa epizootik *H. citriformis* pada populasi WBC biasanya terjadi pada tanaman padi yang telah mencapai stadia generatif. Keberhasilan pemanfaatan miselia sebagai sumber inokulum dapat menjadi langkah awal untuk pengembangan lebih lanjut.

KESIMPULAN

Berdasarkan karakter morfologis dan analisis sekuen ITS, jamur entomopatogen dari genus *Hirsutella* yang menginfeksi WBC asal Bogor terkonfirmasi sebagai *H. citriformis*. Berdasarkan nilai LT_{50} , tingkat efikasi aplikasi propagul miselia *H. citriformis* dalam mengendalikan WBC setara dengan tingkat efikasi oleh konidia, lebih lambat hanya 0,5 hari. Nilai LC_{50} miselia yang sebesar 2,303 g/l cukup layak untuk diaplikasikan dalam skala luas, apalagi produksi miselia pada media biakan lebih mudah dan cepat dibanding dengan produksi konidianya. Dengan demikian, miselia berpotensi sebagai propagul aktif dan agensia alternatif untuk pengembangan biopestisida berbahan aktif *H. citriformis* untuk pengendalian WBC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian melalui program SMARD. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Iman, Ade Ahmad, Ibu Gentawati, dan Staf Perpustakaan BB Biogen yang telah membantu selama pelaksanaan dan penulisan hasil penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Casique-Valdes, R., Reyes-Martinez, A., Sanchez-Peña, S., Bidochka, M. & Lopez-Arroyo, J. (2011) Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94 (3), 703–705.
- Deacon, J.W. (2006) *Fungal Biology*. Malden, US, Blackwell Publishing.
- Dwiastuti, M.E. (2005) Jamur patogen serangga *Hirsutella citriformis*. *IPTEK Hortikultura*, 1, 10–13.
- Dwiastuti, M.E. & Kurniawati, M.Y. (2007) Keefektifan entomopatogen *Hirsutella citriformis* (Deuteromycetes: Moniliales) pada kutu psyllid *Diaphorina citri* Kuw. *Jurnal Hortikultura*, 17 (3), 244–252.
- Dwiastuti, M.E., Nawir, W. & Wuryantini, S. (2007). Uji patogenisitas jamur entomopatogen *Hirsutella citriformis*, *Beauveria bassiana*, dan *Metarhizium anisopliae* secara eka dan dwi infeksi untuk mengendalikan *Diaphorina citri* Kuw. *Jurnal Hortikultura*, 17 (1), 75–80.
- Humber, R.A. (2005) *Entomopathogenic fungal identification*. New York, NY, USDA-ARS Plant Protection Research Unit.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A. & Jaronski, S.T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. In: Roy, H., Vega, F., Chandler, D., Goettel, M., Pell, J. & Wajnberg, E. (eds.) *The ecology of fungal entomopathogens*. New York, Springer.
- Li, M., Lin, H., Li, S., Chen, P., Jin, L. & Yang, J. (2012) Virulence of entomopathogenic fungi to adults and eggs of *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *African Journal of Agricultural*, 7, 2183–2190.
- Meyer, J.M., Hoy, M.A. & Boucias, D.G. (2007) Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 101–109.
- Pérez-González, O., Rodríguez-Guerra, R., López-Arroyo, J.I., Sandoval-Coronado, C.F. & Maldonado-Blanco, M.G. (2015) Radial growth, sporulation, and virulence of mexican isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist*, 40 (1), 111–120.
- Rombach, M.C., Aguda, R.M., Shepard, B.M. & Roberts, D.W. (1986) Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environmental Entomology*, 5, 1070–1073.
- Satpathi, C., Acharjee, P. & Saha, J. (2016) Natural mycosis of rice brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in Eastern India. *The American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 26, 195–204.
- Simmons, D.R., Kepler, R.M., Rehner, S.A. & Groden, E. (2015) Phylogeny of *Hirsutella* species (Ophiocordycipitaceae) from the USA: Remediating the paucity of *Hirsutella* sequence data. *International Mycological Association Fungus*, 6 (2), 345–356.
- Subandiyah, S., Nikoh, N., Sato, H., Wagiman, F., Tsuyumyu, S. & Fukatsu, T. (2000) Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41, 509–513.
- Toledo, A.V., Simurro, M.E. & Balatti, P.A. (2013) Morphological and molecular characterization of a fungus, *Hirsutella* sp. isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Insect Science*, 13 (1), 1–18.
- Vega, F.E. & Kaya, H.K. (2007) *Insect Pathology*. 1st Edition. San Diego, Academic Press.

Wahyudi, P. (2008) Produksi mikoinsektisida dari propagul kapang *Beauveria bassiana*. *Jurnal Matematika, Sains, dan Teknologi*, 9 (2), 68–79.

Wraight, S.P., Jackson, M.A. & de Kock, S.L. (2001) Production, stabilization, and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C. & Magan, N. (eds.) *Fungal as biological agents: Progress, problems, and potential*. UK, CABI Publishing. pp. 253–288.
